

| | |
|-------------|---|
| 氏 名 | とみもと だいすけ 富本 大介 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（薬学） |
| 学 位 記 番 号 | 富医薬博甲第 180 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 28 年 3 月 4 日 |
| 学位授与の要件 | 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当 |
| 教 育 部 名 | 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程 生命薬科学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase を標的とした新規肥満・2 型糖尿病治療薬の開発：JTT-553 の作用機序解析と有効性評価 (Development of novel anti-obesity and anti-type 2 diabetic drugs as a target of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: Pharmacological characterization of JTT-553 and evaluation of its effects in vivo) |
| 論 文 審 査 委 員 | |
| (主査) | 教 授 今中 常雄 |
| (副査) | 教 授 笹岡 利安 |
| (副査) | 教 授 櫻井 宏明（指導教員） |

論文内容の要旨

肥満は脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義され、主に過剰なエネルギー摂取とエネルギー消費の低下により起こる。肥満人口は世界的に見ても年々増加していることに加えて、肥満は2型糖尿病、脂質異常、高血圧、心血管病等の危険因子であることが知られており、肥満の治療はこれらの合併症を予防、治療する上で重要である。肥満においては、脂肪組織のみならず他の組織においても過剰な triglyceride (TG) の蓄積が起こり、組織障害を惹起する。例えば、骨格筋や肝臓における過剰な TG の蓄積はインスリン抵抗性や非アルコール性肝炎の発症に関与し、心臓における蓄積は心筋症の発症にも関連する。従って、肥満による生活習慣病や心血管病の予防の観点から、脂肪組織のみならず異所性脂肪を減少させることは重要である。

TG 合成においては、グリセロールリン酸経路並びにモノアシルグリセロール経路の2つが主要な経路である。両経路ともに acyl-CoA から acyl 基を diacylglycerol に転移することにより TG 合成が行われる。この最終反応を触媒する酵素が acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) である。DGAT には DGAT1 及び DGAT2 の2つのアイソタイプが同定されており、いずれも様々な組織に発現することが知られている。DGAT1 は特に小腸及び脂肪組織における発現が高く、DGAT2 は肝臓及び脂肪組織における発現が高い。ヒトにおける DGAT1 の欠損例は確認されていないが、DGAT1 遺伝子の配列多型がいくつか知られている。トルコ人女性において認められた C79T 変異では、BMI、拡張期血圧、HDL cholesterol レベルとの関連性が示された。脂肪組織特異的な DGAT1 強発現マウスでは、高脂肪食負荷により顕著な体重の増加を呈した。逆に、DGAT1 欠損マウスは正常に成育し、TG 合成能にも異常は認められないが、高脂肪食負荷による体重増加について、通常食給餌下のマウスの体重と同程度まで低下が見られた。一方、DGAT2 についても若年肥満者においていくつかの遺伝子変異が報告されている。しかしながら、これらの変異と肥満の表現型について関連性は認められていない。これらの DGAT1 に関する知見より、肥満の治療として DGAT1 の活性阻害を標的とする新規肥満・2型糖尿病の開発が期待される。

1. JTT-553 の作用機序解析¹⁾

肥満の治療開発を目指し、DGAT1 阻害活性を有する低分子化合物探索を行った。その結果、新規 DGAT1 阻害剤として JTT-553 ([*trans*-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl]acetic acid monobenzenesulfonate) を創出した。そこで、JTT-553 の *in vitro* 薬理プロファイルの解析を目的として、ヒト DGAT1 活性に対する阻害作用、種差の評価としてヒト、ラット及びマウ

ス由来の小腸ミクロソームを用いた DGAT 活性に対する阻害作用を評価した。また、DGAT1 のアイソザイムである DGAT2 及び DGAT1 と高い相同性を示す ACAT1 に対する JTT-553 の作用を酵素選択性の評価として実施した。その結果、JTT-553 はヒト DGAT1 に対して強力且つ選択的な阻害作用を示した。また JTT-553 の DGAT1 阻害作用はヒト・ラット・マウス間で同等であった。

DGAT1 は特に小腸及び脂肪組織において高発現することから、生体において DGAT1 は食餌由来の TG 吸収及び脂肪組織における TG 蓄積に関与すると考えられた。加えて小腸における TG 代謝について着目すると、食餌由来の TG はリパーゼによって消化管管腔内で脂肪酸とモノアシルグリセロールに分解される。これらの基質は小腸細胞内でカイロミクロン TG に再構成されることで血中へと分泌される。消化管管腔内におけるこれらの TG 合成の基質は生理活性を有し、摂食抑制作用を示すことが知られている。小腸における DGAT1 阻害が消化管管腔内の脂肪酸及びグリセロールレベルを増加させると推察され、さらには摂食を調節する可能性が考えられた。JTT-553 の小腸における TG 吸収抑制作用の評価を目的としてラットを用いたオイル負荷試験を実施した。JTT-553 はオイル負荷後の血漿中 TG 及びカイロミクロン TG を用量増加に応じて抑制した。脂肪組織における TG 合成抑制作用については、[1-¹⁴C] oleic acid を腹腔内投与したマウスの副睾丸上脂肪組織中 TG 合成に対する作用を評価した。JTT-553 はマウス副睾丸上脂肪組織中 TG 合成を用量増加に応じて抑制した。摂食抑制作用の評価については、TG 吸収抑制に基づくことが考えられたため、高脂肪食給餌下ラットの摂食量に対する JTT-553 の用量依存的な作用の評価及び 3.1%、13%、35% (w/w) fat diet の 3 つの飼料を用いた飼料中脂肪含量依存性評価の 2 つの試験を実施した。その結果、JTT-553 は用量増加且つ飼料中脂肪含量に応じた摂食抑制作用を示した。小腸における TG 吸収抑制作用、脂肪組織における TG 合成抑制作用、摂食抑制作用の 3 つの作用により、JTT-553 は肥満動物の体重を低下させることが期待されたため、diet-induced obese (DIO) モデルラットに対する JTT-553 の反復投与試験を行った。JTT-553 の反復投与により DIO ラットの摂食量の低下、体重の低下が認められた。さらには摂餌量当たりの体重増加量（摂餌効率）の低下も認められた。

2. JTT-553 の抗肥満・抗糖尿病作用²⁾

1 章での検討により、JTT-553 は小腸における TG 吸収抑制作用、脂肪組織における TG 合成抑制作用、飼料中脂肪含量依存的な摂食抑制作用を有し、これらの作用機序により JTT-553 は DIO ラットモデルにおいて抗肥満作用を示すことが明らかとなった。そこで、JTT-553 の抗肥満作用が実際に糖代謝を改善しうるかについて明らかにするため、肥満・2 型糖尿病モデルにおける抗糖尿病作用の評価を行った。2 型糖尿病の発症においては、環境因子と遺伝因子の 2 つが影響することから、評価に際しては食餌性の DIO マウスと遺伝性の KK-Ay マウスの 2 つの肥満・2 型糖尿病モデルを用いて行った。

JTT-553 の反復投与により DIO マウスの体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められ、糖負荷試験における耐糖能・インスリン抵抗性の改善が認められた。また、DIO マウス由来の摘出脂肪組織において JTT-553 の反復投与によりインスリン依存的な糖取り込み能の改善が認められた。さらに、遺伝

性の 2 型糖尿病モデルである KK-Ay マウスにおいては, JTT-553 の反復投与により体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められ, 非絶食・絶食下いずれにおいても血糖値の低下が認められた。脂肪組織においてはインスリン抵抗性の惹起に關与する TNF- α mRNA の低下及びインスリン依存的な糖取り込みを担う GLUT4 mRNA の増加が認められた。

3. 総括

DGAT1 は主に小腸及び脂肪組織に発現し, TG 合成の最終反応を触媒する酵素である。食事由来の TG は消化管管腔内でリパーゼにより脂肪酸及びモノアシルグリセロールに分解された後, 小腸細胞内で DGAT1 を介してカイロミクロン TG へ再構築される。体内へ吸収された TG は肝臓において貯蔵され, 他にも TG や脂肪酸として血液中にも存在し, 全身を循環する。脂肪組織においては循環血液より余剰な脂肪酸が取り込まれ, DGAT1 を介して TG として貯蔵される。JTT-553 は小腸及び脂肪組織における DGAT1 を強力且つ選択的に阻害し, 小腸における TG 吸収を抑制し, 脂肪組織においては TG 蓄積を抑制する作用を示す。また, JTT-553 は小腸における TG 吸収を抑制した結果, DGAT1 の基質となる脂肪酸及びグリセロールの消化管内濃度の増加を示すことが考えられる。おそらく DGAT1 の基質濃度の増加を介して, JTT-553 は飼料中脂肪含量依存的に摂食抑制作用を示す。これら小腸における TG 吸収抑制作用, 脂肪組織における TG 蓄積抑制作用, 脂肪摂取量依存的な摂食抑制作用を介して JTT-553 は脂肪重量を低下し, 体重低下作用を示す。さらには, JTT-553 は体重低下作用に基づいて脂肪組織及び全身のインスリン抵抗性・糖代謝に対する改善作用を示すことから, JTT-553 は肥満及び 2 型糖尿病の治療薬としての有用性が期待される。

[参考文献]

- 1) Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Akiyama Y., Ohta T., Kakutani M., Ohkuma Y., and Ogawa N.: Pharmacological characterization of [*trans*-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl]acetic acid monobenzenesulfonate (JTT-553), a novel acyl CoA: diacylglycerol transferase (DGAT) 1 inhibitor. *Biol Pharm Bull.* 38(2): 263-269 (2015)
- 2) Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Kobayashi A., Ohta T., Kakutani M., Imanaka T., and Ogawa N. JTT-553, a novel Acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 inhibitor, improves glucose metabolism in diet -induced obesity and genetic T2DM mice. *J Pharmacol Sci.* 129(1): 51-58 (2015)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

肥満人口は世界的に見ても年々増加している。肥満は 2 型糖尿病、脂質代謝異常、高血圧、心血管疾患等の危険因子であり、肥満の治療はこれらの合併症を予防、治療する上で重要である。また、過剰な triglyceride (TG) の蓄積は組織障害を起こすことより、脂肪組織のみならず異所性脂肪を減少させることは重要である。TG 合成は、グリセロールリン酸経路ならびにモノアシルグリセロール経路の 2 つが主要な経路であり、両経路ともに acyl-CoA から acyl 基を diacylglycerol に転移することにより TG 合成が行われる。この最終反応を触媒する酵素が acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT)であり、2 つのアイソタイプが同定されている。そのうち DGAT1 は、小腸及び脂肪組織における発現が高く、DGAT1 欠損マウスで肥満が抑制されることより、DGAT1 を標的した新規肥満・2 型糖尿病治療薬の開発が期待されている。学位申請者の富本大介氏は、新規 DGAT1 阻害化合物としての JTT-553 の作用機構ならびに抗肥満・抗糖尿病作用を検討し、DGAT1 阻害による治療薬開発の可能性を提示した。本学位論文の内容と審査結果は以下の通りである。

1. JTT-553 の作用機序解析

新規低分子化合物 JTT-553 の DGAT1 の阻害作用をヒト、ラット及びマウス由来の小腸ミクロソームを用いて評価した。さらに、DGAT1 及び DGAT2 と高い相同性を示す ACAT1 に対する阻害作用も検討した。その結果、JTT-553 はヒト DGAT1 に対して強力かつ選択的な阻害作用を有し、その DGAT1 阻害作用はヒト・ラット・マウス間で同等であることを明らかにした。また、小腸における DGAT1 阻害は、消化管管腔内の脂肪酸及びグリセロールレベルを増加させ、摂食を調節する可能性も考えられた。そこで、JTT-553 の小腸における TG 吸収抑制作用を検討するため、ラットに JTT-553 を投与し、オイル負荷試験を実施した。その結果、JTT-553 は血漿中 TG 及びカイロミクロン TG を用量増加に応じて抑制すること、マウス副睾丸上脂肪組織中 TG 合成を用量増加に応じて抑制することを明らかにした。次いで、高脂肪食給餌下ラットの摂食量に対する JTT-553 の用量依存的な作用を検討することにより、JTT-553 は用量増加かつ飼料中脂肪含量に応じた摂食抑制作用をもつことを示した。さらに、JTT-553 の反復投与により DIO ラットの摂食量の低下、体重の低下、さらには摂餌量当たりの体重増加量（摂餌効率）の低下を明らかにした。

2. JTT-553 の抗肥満・抗糖尿病作用

JTT-553 の抗肥満作用が実際に糖代謝を改善するかどうかを検証するため、肥満・2 型糖尿病モデルにおける抗糖尿病作用を検討した。2 型糖尿病の発症においては、環境因子と遺伝因子の 2 つが影響することから、食餌性の DIO マウスと遺伝性の KK-Ay マウスの 2 つの肥満・2 型糖尿病モデルを用いた。JTT-553 の反復投与により DIO マウスの体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められ、糖負荷試験における耐糖能・インスリン抵抗性の改善が認められることを明らかにした。また、DIO マウス由来の摘出脂肪組織において、JTT-553 の反復投与によりインスリン依存的な糖取込みの改善が認められることも示した。さらに、遺伝性の 2 型糖尿病モデルである KK-Ay マウスにおいては、JTT-553 の反復投与により体重・脂肪組織重量・肝臓中 TG 含量の低下が認められること、非絶食・絶食下いずれにおいても血糖値の低下が認められることを示した。JTT-553 の投与により、脂肪組織においてはインスリン抵抗性の惹起に関与する TNF- α mRNA の低下及びインスリン依存的な糖取り込みを担う GLUT4 mRNA の増加を明らかにした。

以上のように富本大介氏は、JTT-553 は小腸及び脂肪組織における DGAT1 を強力かつ選択的に阻害し、小腸における TG 吸収を抑制すること、脂肪組織においては TG 蓄積を抑制する作用をもつことを示した。また、JTT-553 は小腸における TG 吸収を抑制した結果より、DGAT1 の基質となる脂肪酸及びグリセロールの消化管内濃度が増加することを示唆した。DGAT1 の基質濃度の増加を介して、JTT-553 は飼料中脂肪含量依存的に摂食抑制作用を示すことを提示した。JTT-553 の小腸における TG 吸収抑制作用、脂肪組織における TG 蓄積抑制作用、脂肪摂取量依存的な摂食抑制作用を介した脂肪重量低下作用、体重低下作用は、DGAT1 をターゲットとした新規肥満・2 型糖尿病治療薬の開発の有用性を示すものである。JTT-553 については、体重低下作用に基づいて脂肪組織及び全身のインスリン抵抗性・糖代謝に対する改善作用を示すことから、JTT-553 の肥満及び 2 型糖尿病の治療薬としての有用性が期待される。これらの研究は国際学術誌に掲載され、国内学で高く評価されている。主査および副査は、富本大介氏に口頭試問を行うとともに、論文内容について審査し、博士（薬学）を授与するに値すると判定した。

1. Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Akiyama Y., Ohta T., Kakutani M., Ohkuma Y., and Ogawa N.: Pharmacological characterization of [*trans*-5'-(4-amino-7,7-dimethyl-2-trifluoromethyl-7*H*-pyrimido[4,5-*b*][1,4]oxazin-6-yl)-2',3'-dihydrospiro(cyclohexane-1,1'-inden)-4-yl]acetic acid monobenzenesulfonate (JTT-553), a novel acyl CoA: diacylglycerol transferase (DGAT) 1 inhibitor. *Biol Pharm Bull.* 38(2): 263-269

(2015)

2. Tomimoto D., Okuma C., Ishii Y., Kobayashi A., Ohta T., Kakutani M., Imanaka T., and Ogawa N. JTT-553, a novel Acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 inhibitor, improves glucose metabolism in diet-induced obesity and genetic T2DM mice. *J Pharmacol Sci.* 129(1): 51-58 (2015)